

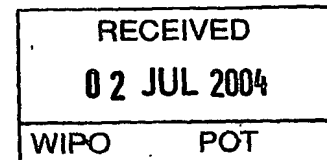


Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND.

N. RM2003A000370 DEL 29/07/2003

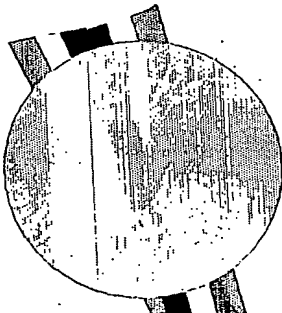


*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

03 GIU. 2004

Roma, li



IL FUNZIONARIO

Dr.ssa Ivana Pugliese

Ivana Pugliese

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione MINCHIOTTI Gabriella
Residenza NAPOLI - IT codice MNCGR65A66F
2) Denominazione PERSICO Maria
Residenza NAPOLI - IT codice PRSMRA50E54F839G

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome CAPASSO Olga, DE SIMONE Domenico, FIORUZZI Maria Augusta cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza DE SIMONE & PARTNERS S.P.A.
via VIA VINCENZO BELLINI n. 20 città ROMA cap 00198 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

VEDI SOPRA

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____

gruppo/sottogruppo ☐ / ☐

"METODO PER PROMUOVERE IL DIFFERENZIAMENTO DI NEURONI DA CELLULE STAMINALI".

ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒SE ISTANZA: DATA ☐ / ☐ / ☐N. PROTOCOLLO ☐

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) MINCHIOTTI, Gabriella 3) PARISI, Silvia
2) PERSICO, Maria 4) _____

F. PRIORITA'

Nazione o
organizzazione

Tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/RSCIOGLIMENTO RISERVE
Data N° Protocollo

1) Nessuna. ☐ / ☐ / ☐ ☐ / ☐ / ☐
2) _____ ☐ / ☐ / ☐ ☐ / ☐ / ☐

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna.

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ PROV ☐ n. pag 15 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni
(obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) ☒ PROV ☐ n. tav 3 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) ☒ RIS ☐ Dichiarazione sostitutiva di lettera d'incarico
Doc. 4) ☐ RIS ☐ designazione inventore
Doc. 5) ☐ RIS ☐ documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) ☐ RIS ☐ autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) ☐ nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale € 188,51.-

obbligatorio

COMPILATO IL 29/07/03 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Olga Capasso

De Simone & Partners S.p.A.

CONTINUA (SI/NO) ☒DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA (SI/NO) ☒CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO AGRICOLTURA DI ROMA

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

RM 2003 A 000370codice 58

Reg. A

L'anno DUEMILATRE, il giorno VENTINOVE del mese di LUGLIOIl (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprarportato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE
Ufficiale Rogante,
Silvia Altieri

RM 2003 A 000370 N.G.

A. RICHIEDENTE (I)

<input checked="" type="checkbox"/>	Denominazione	PARISI Silvia			
	Residenza	FRATTAMAGGIORE (NA) - IT	codice	PRSSLV74P70F839Z	
<input type="checkbox"/>	Denominazione				
	Residenza		codice		
<input type="checkbox"/>	Denominazione				
	Residenza		codice		
<input type="checkbox"/>	Denominazione				
	Residenza		codice		
<input type="checkbox"/>	Denominazione				
	Residenza		codice		
<input type="checkbox"/>	Denominazione				
	Residenza		codice		

E. INVENTORI DESIGNATI

<input type="checkbox"/>	cognome nome	<input type="checkbox"/>	cognome nome
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	

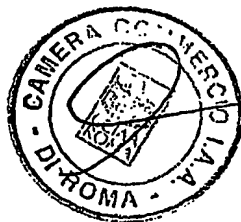
F. PRIORITA'

Nazione o organizzazione	Tipo di priorità	Numero di domanda	Data di deposito	Allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE	
					Data	N° protocollo
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Olga Capasso
De Simone & Partners S.p.A.*Olga Capasso*

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

RM 2003 A 000370

DATA DI DEPOSITO

DATA DI RILASCIO

☐ / ☐ / ☐
☐ / ☐ / ☐

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione Minchiotti Gabriella, Parisi Silvia, Persico Maria
Residenza Napoli (IT)

D. TITOLO

Metodo per promuovere il differenziamento di neuroni da cellule staminali

Classe proposta (sez./cl./scl/)

☐

(gruppo sottogruppo)

☐ / ☐

L. RIASSUNTO

E' descritto un metodo per indurre cellule staminali a differenziare in cellule neuronali che comprende l'esposizione di dette cellule per un tempo e in quantità efficaci ad un inibitore della proteina Cripto o alternativamente l'ingegnerizzazione di dette cellule in maniera tale che non esprimano una proteina Cripto endogena funzionale.

M. DISEGNO



DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale a titolo:

"Metodo per promuovere il differenziamento di neuroni da cellule staminali"

a nome: GABRIELLA MINCHIOTTI, SILVIA PARISI, MARIA PERSICO

inventori: gli stessi Richiedenti

Campo dell'invenzione

L'invenzione concerne un metodo per promuovere il differenziamento di neuroni. Più in particolare l'invenzione riguarda un metodo che utilizza cellule staminali embrionali in cui l'attività del gene *cripto* sia assente e/o inibita per indurre cellule staminali a differenziare in neuroni.

La famiglia di proteine EGF-CFC (comprendente Cripto, sia umana che di topo, che di pollo, cryptic, oep, FRL-1, (Minchiotti et al., 2001) è coinvolta nello sviluppo embrionale dei vertebrati (Ding et al., 1998; Xu et al., 1999). Cripto rappresenta un marcatore molecolare di cellule staminali embrionali indifferenziate sia murine (Minchiotti et al., 2000) che umane (Brivanlou et al., 2003). Gli autori della presente invenzione hanno investigato il ruolo della proteina Cripto nella cardiomiogenesi e nella neurogenesi, e hanno trovato che l'inizio dell'esposizione a Cripto è cruciale per indurre il differenziamento di cellule embrionali staminali (ES) in cardiomiociti ed inibire il differenziamento neurale. L'invenzione trova una vantaggiosa applicazione come metodo per il trattamento di cellule staminali da usare in trapianti nei casi di malattie neurodegenerative come ad esempio il morbo di Parkinson, la malattia di Alzheimer, etc.

Le cellule ES rappresentano una sorgente pressochè illimitata di cellule da potere utilizzare per la terapia cellulare nella cura di malattie degenerative (Hynes and Rosenthal, 2000; Liu et al., 2000; Min et al., 2002; Svendsen and Smith, 1999). E' noto, infatti che le cellule ES sono in grado di proliferare ed, inoltre, di differenziare in tutti i tipi cellulari presenti in un organismo. Recentemente, è stato indicato che le cellule ES sono ottimi candidati per la terapia cellulare di malattie neurodegenerative, essendo capaci di dare origine agli appropriati tipi cellulari allorchè innestate *in vivo* (Arenas, 2002). In questo scenario, diventa cruciale sviluppare metodi sperimentali atti a promuovere il differenziamento cellulare a partire da cellule ES indifferenziate ed, infine, dimostrare che tali cellule siano effettivamente in grado di svolgere la funzione richiesta per il trattamento della malattia.

Studi precedenti avevano dimostrato che il trattamento di cellule ES wild-type con acido retinoico era in grado di promuoverne il differenziamento neurale (Bain et al., 1995). Il limite di questo protocollo sperimentale è legato agli effetti collaterali del trattamento con l'acido retinoico; questo è infatti un potente agente teratogeno, e determina alterazioni dello sviluppo del sistema nervoso durante l'embriogenesi *in vivo* (Soprano and Soprano, 1995; Sucov and Evans, 1995). Pertanto, è di cruciale importanza definire protocolli sperimentali alternativi che evitino il trattamento delle cellule ES con acido retinoico allo scopo di ottenere neuroni. Una strategia alternativa vantaggiosa per direzionare il differenziamento cellulare, prevede l'introduzione di geni di controllo dello sviluppo in cellule staminali, sebbene vi siano diversi effetti indesiderati, dovuti alla varianza clonale, alla dipendenza dal promotore

ed alla capacità di alcune cellule staminali di reprimere l'espressione di transgeni espressi ectopicamente (Boheler et al., 2002). Per superare questo problema, è necessario identificare molecole secrete in grado di indurre e/o inibire il differenziamento delle cellule staminali verso la linea cellulare prescelta.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per indurre cellule staminali a differenziare in cellule neuronali che comprende l'esposizione di dette cellule per un tempo e in quantità efficaci ad un inibitore della proteina Cripto o alternativamente l'ingegnerizzazione di dette cellule in maniera tale che non esprimano una proteina Cripto endogena funzionale.

Preferibilmente l'esposizione ad un inibitore della proteina Cripto avviene nelle fasi precoci del differenziamento delle cellule staminali.

Preferibilmente l'inibitore della proteina è un anticorpo anti-Cripto o suoi frammenti funzionali.

E' oggetto della presente invenzione l'uso della proteina cripto o di suoi inibitori per la preparazione di una composizione in grado di modulare il differenziamento di cellule staminali verso la linea neuronale.

La presente invenzione verrà ora descritta in suoi esempi non limitativi in riferimento alle seguenti figure:

Figura 1. Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale utilizzato per il differenziamento di cellule ES in cardiomiociti (adattato da (Maltsev et al., 1993).

Figura 2. Dinamica del segnale di Cripto durante il differenziamento delle cellule staminali. Definizione dell'attività temporale di Cripto. Percentuale di Corpi Embrioidi (Embryoid Bodies, EB) Cripto^{-/-}

contenenti aree contrattili dopo aggiunta della proteina Cripto ricombinante. 10 µg/ml di proteina Cripto solubile sono stati aggiunti agli EB ad intervalli di 24 ore dal tempo 0 del saggio di differenziamento *in vitro* (schema in Figura 1). Il numero di EB contenenti aree contrattili è stato indagato tra i giorni 8 e 12 del differenziamento *in vitro*.

Figura 3. Cripto promuove il differenziamento cardiaco ed inibisce il differenziamento neurale delle cellule ES.

(A) Differenziamento cardiaco e neuronale di EBs Cripto^{-/-} come indicato da esperimenti di immunofluorescenza. EB Cripto^{-/-} di 2 giorni sono stati trattati (a,c) e non (b,d) con 10 µg/ml di proteina Cripto solubile per 24 ore. Al giorno 12 del differenziamento è stata analizzata l'espressione della miosina sarcomerica e della proteina β-tubulina isotipo III, mediante l'uso di anticorpi anti MF-20 (rosso: a,b) e anti-β-tubulina isotipo III (verde: c,d), rispettivamente.

(B) Percentuale di EB Cripto^{-/-} positivi anti-β-tubulina isotipo III o MF-20. Dieci µg/ml di proteina Cripto solubile sono stati aggiunti agli EB Cripto^{-/-} ad intervalli di 24 ore dal tempo 0 del saggio di differenziamento *in vitro* (si veda schema in Figura 1). Al giorno 12 del differenziamento l'espressione di β-tubulina isotipo III e/o miosina sarcomerica è stata analizzata mediante immunofluorescenza utilizzando gli anticorpi anti β-tubulina isotipo III e anti MF-20, rispettivamente.

Materiali e Metodi

Plasmidi

Cripto-His qui rinominato "Cripto secreto" è stato già descritto (Minchiotti et al., 2001). Il cDNA Cripto-His (sequenza dal nt -5 al nt



+468 del cDNA cripto) era clonato nel vettore di espressione pCDNA3 (Invitrogen) Il cDNA è stato già descritto (Minchiotti et al., 2001).

Culture cellulari e differenziamento ES

Sono state utilizzate le linee cellulari ES RI (cellule staminali embrionali di topo wild-type, (Nagy et al., 1993) e Cripto^{-/-}, DE7 e DE14. Cripto^{-/-} DE7 e DE14 derivano da trasfezione di due cloni indipendenti ES Cripto^{+/-} (Xu et al., 1999). Cellule ES wt e Cripto^{-/-} sono state mantenute allo stato indifferenziato in coltura con uno strato di fibroblasti embrionali di topo, trattati con mitomicina C (MEF), secondo procedure standard. Il terreno usato era terreno di Dulbecco modificato da Eagle ad alto contenuto di glucosio (Celbio) contenente 15% siero fetale bovino (Hyclone), 0.1 mM β -mercaptoetanolo (Sigma), 1 mM sodio piruvato (GIBCO), 1X amminoacidi non essenziali (GIBCO), 2 mM glutammina (GIBCO), 100U/ml penicillina/streptomycin (GIBCO) e 10³ U/ml fattore di inibizione della leucemia (LIF) (Chemicon). Per il differenziamento *in vitro* in cardiomiociti, le cellule ES erano coltivate in corpi embrioidi (EB), essenzialmente come descritto (Maltsev et al., 1993; Wobus et al., 1991). In breve, 400 cellule in 20 μ l di terreno di coltura senza LIF (Leukemia Inhibitor Factor, utilizzato per mantenere le cellule ES in uno stato indifferenziato) erano poste sui coperchi delle piastre di coltura riempiti con PBS e coltivati in gocce sospese per 2 giorni. Dopo altri 3 giorni di coltura in piastre di Petri per batteriologia (Figura 1) in terreno di coltura senza LIF, gli EB di 5 giorni erano piastrati separatamente su piastre a 48 pozzetti ricoperte di gelatina per un'analisi morfologica. La contrazione ritmica degli EB, che indica il

differenziamento in muscolo cardiaco, è stata monitorata usando un microscopio a contrasto di fase (Leica).

Trasfezione delle cellule e purificazione della proteina

La proteina Cripto ricombinante secreta già denominata Cripto-His era ottenuta e purificata come già descritto (Minchiotti et al., 2001). In breve, la proteina era purificata da terreno condizionato di un clone di cellule 293 stabilmente trasfettato (ottenuto con il vettore pCDNA3 cripto-His (Minchiotti et al., 2001), usando il sistema di purificazione di proteine Qiaexpress (Quiagen). La proteina purificata era dializzata contro 50mM tampone sodio fosfato, pH 8.

Immunofluorescenza su EB

Gli EB sono stati cresciuti in adesione. Al giorno 12 del differenziamento sono stati fissati per 30 min. a temperatura ambiente in una soluzione di paraformaldeide al 4% per il trattamento con l'anticorpo β -tubulina isotipo III, Sigma), o in ghiaccio in una soluzione di metanolo:acetone in un rapporto di 7:3 per il trattamento con l'anticorpo anti-miosina sarcomerica MF-20 ottenuto da Developmental Studies Hybridoma Bank, the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City. Dopo avere effettuato 3 lavaggi con buffer fosfato (PBS, GIBCO cat. no. 20012-019), gli EB sono stati trattati con 0.1% Triton X-100 (Sigma), 10% siero pre-immune di capra (DAKO, code no. X0907) in PBS e successivamente incubati con i rispettivi anticorpi primari in una soluzione al 10% di siero pre-immune di capra in PBS, per 2 ore a temperatura ambiente. Le diluizioni di anticorpo primario utilizzate sono state le seguenti: anti- β tubulina isotipo III (1:400), MF-20 (1:50). Successivamente gli EB sono stati lavati con PBS e incubati a

temperatura ambiente per 30 min. in una soluzione di siero pre-immune di capra al 10% in PBS, in presenza dei seguenti anticorpi secondari: anti-anticorpo di topo prodotto in capra e coniugato con rodamina (Jackson Laboratories, anticorpo primario MF-20) e anti anticorpo di topo prodotto in capra e coniugato con fluoresceina (Jackson Laboratories, anticorpo primario anti- β tubulina isotipo III). In seguito gli EB sono stati lavati estensivamente in PBS e quindi contro-colorati con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenil-indol di-idrocloruro, idrato, SIGMA) per visualizzare i nuclei. Infine gli EB sono stati montati utilizzando il mezzo Vecta Shield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) per l'analisi al microscopio con una luce epifluorescente. Le immagini sono state acquisite mediante l'uso della telecamera Axiocam ARC (Zeiss).

Risultati

Una proteina Cripto ricombinante solubile, in cui il C-terminale idrofobico è sostituito con un epitopo 6xHis, è stata usata (Cripto-His; (Minchiotti et al., 2001) allo scopo di ricostituire il segnale di Cripto per aggiunta della proteina stessa direttamente alle cellule ES Cripto^{-/-} secondo lo schema indicato in Figura 1. L'aggiunta di Cripto durante l'intervallo dei giorni 0-2 restaura efficacemente la capacità di differenziamento delle cellule ES Cripto^{-/-} in cardiomiociti. L'aggiunta a tempi seguenti provoca una riduzione drammatica del differenziamento dei cardiomiociti (Figura 2). Risultati comparabili sono stati ottenuti con due cloni ES Cripto^{-/-} (DE7 e DE14(Xu et al., 1998), escludendo pertanto qualsiasi differenza di fenotipo dovuta a variazione clonale (Figura 2). Questi dati indicano che lo stimolo *in trans* con la proteina Cripto solubile era pienamente efficiente per la promozione

dell'induzione e del differenziamento dei cardiomiociti e, in maniera più rilevante, definisce esattamente quando l'attività di Cripto è richiesta per promuovere la determinazione verso la linea cardiaca.

Le cellule ES Cripto^{-/-} differenziano in neuroni in assenza di stimoli induttivi

Quando piastrati su un substrato adesivo, gli EB Cripto^{-/-} mostrano la presenza di una fitta rete cellulare con una morfologia simile a quella dei neuroni. Tale caratteristica morfologica non si osserva mai in EB wild type o in EB Cripto^{-/-} in cui il segnale di Cripto è stato ripristinato mediante aggiunta della proteina ricombinante, o mediante trasfezione con un vettore di espressione per Cripto. Allo scopo di confermare che tali cellule siano effettivamente neuroni, sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza su EB Cripto^{-/-} trattati e non con la proteina Cripto ricombinante secreta, utilizzando anticorpi che riconoscono una forma neuro-specifica della proteina β III-tubulina. Tale anticorpo identifica gruppi di cellule positive in EB derivati da cellule ES Cripto^{-/-} non trattati con la proteina Cripto, dimostrando così che si tratta effettivamente di neuroni. Il 70% degli EB Cripto^{-/-} analizzati mostra cellule positive all'anticorpo anti- β -tubulina isotipo III, indicando quindi la presenza di neuroni in una elevata percentuale. Cellule positive all'anticorpo anti- β -tubulina isotipo III sono totalmente assenti in EB Cripto^{-/-} trattati con la proteina Cripto che, al contrario, mostrano ampie aree di cellule positive all'anticorpo MF20 che riconosce la miosina sarcomerica ed è utilizzato per evidenziare i cardiomiociti. Questi dati indicano, pertanto, che l'assenza di Cripto nelle cellule staminali



embrionali determina il differenziamento spontaneo dei neuroni, in assenza di stimoli induttivi.

Allo scopo di modulare il segnale di Cripto, la proteina è stata aggiunta a tempi diversi durante il differenziamento degli EB derivati dalle cellule ES Cripto^{-/-}. L'aggiunta di Cripto nell'intervallo 0-2 giorni del differenziamento promuove nuovamente il differenziamento cardiaco e, allo stesso tempo, causa una drammatica riduzione del numero di EB che mostrano neuroni, indicando pertanto che il ripristino del segnale di Cripto inibisce la capacità degli EB di differenziare spontaneamente in neuroni. Al contrario, l'aggiunta di Cripto in una finestra temporale diversa (3-6 giorni), non è capace di recuperare il fenotipo cardiaco delle cellule ES Cripto^{-/-} e, allo stesso tempo, non altera la capacità delle stesse cellule di differenziare spontaneamente in neuroni, come indicato dalla percentuale elevata di EB che mostrano la presenza di neuroni, e dall'assenza di cardiomiociti.

Questi risultati indicano che il segnale di Cripto, in una finestra temporale ristretta e molto precoce (0-2 giorni) del differenziamento, inibisce il differenziamento neurale delle cellule staminali embrionali, e ne promuove il differenziamento cardiaco.

Bibliografia

- Arenas, E. 2002. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull.* 57:795-808.
- Bain, G., D. Kitchens, M. Yao, J.E. Huettner, and D.I. Gottlieb. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol.* 168:342-57.

- Boheler, K.R., J. Czyz, D. Tweedie, H.T. Yang, S.V. Anisimov, and A.M. Wobus. 2002. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 91:189-201.
- Brivanlou, A.H., F.H. Gage, R. Jaenisch, T. Jessell, D. Melton, and J. Rossant. 2003. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science.* 300:913-6.
- Ding, J., L. Yang, Y.T. Yan, A. Chen, N. Desai, A. Wynshaw-Boris, and M.M. Shen. 1998. Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature.* 395:702-7.
- Hynes, M., and A. Rosenthal. 2000. Embryonic stem cells go dopaminergic. *Neuron.* 28:11-4.
- Liu, S., Y. Qu, T.J. Stewart, M.J. Howard, S. Chakraborty, T.F. Holekamp, and J.W. McDonald. 2000. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6126-31.
- Maltsev, V.A., J. Rohwedel, J. Hescheler, and A.M. Wobus. 1993. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev.* 44:41-50.
- Min, J.Y., Y. Yang, K.L. Converso, L. Liu, Q. Huang, J.P. Morgan, and Y.F. Xiao. 2002. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol.* 92:288-96.
- Minichiotti, G., G. Manco, S. Parisi, C.T. Lago, F. Rosa, and M.G. Persico. 2001. Structure-function analysis of the EGF-CFC family

member Cripto identifies residues essential for nodal signalling.

Development. 128:4501-10.

Minchiotti, G., S. Parisi, G. Liguori, M. Signore, G. Lania, E.D.

Adamson, C.T. Lago, and M.G. Persico. 2000. Membrane-anchorage of Cripto protein by glycosylphosphatidylinositol and its distribution during early mouse development. *Mech Dev*. 90:133-42.

Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly, and J.C. Roder.

1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:8424-8.

Soprano, D.R., and K.J. Soprano. 1995. Retinoids as teratogens. *Annu*

Rev Nutr. 15:111-32.

Sucov, H.M., and R.M. Evans. 1995. Retinoic acid and retinoic acid

receptors in development. *Mol Neurobiol*. 10:169-84.

Svendsen, C.N., and A.G. Smith. 1999. New prospects for human stem-

cell therapy in the nervous system. *Trends Neurosci*. 22:357-64.

Wobus, A.M., G. Wallukat, and J. Hescheler. 1991. Pluripotent mouse

embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers.

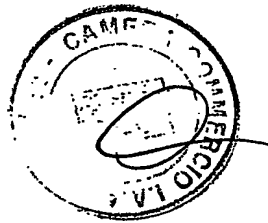
Differentiation. 48:173-82.

Xu, C., G. Liguori, E.D. Adamson, and M.G. Persico. 1998. Specific

arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1. *Dev Biol*. 196:237-47.

Xu, C., G. Liguori, M.G. Persico, and E.D. Adamson. 1999. Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. *Development*. 126:483-94.

dgscapress



RM 2003 A 000370

RIVENDICAZIONI

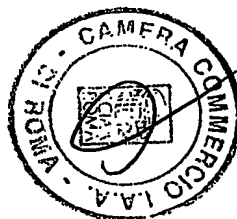
1. Metodo per indurre cellule staminali a differenziare in cellule neuronali che comprende l'esposizione di dette cellule per un tempo e in quantità efficaci ad un inibitore della proteina Cripto o alternativamente l'ingegnerizzazione di dette cellule in maniera tale che non esprimano una proteina Cripto endogena funzionale.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui l'esposizione ad un inibitore della proteina Cripto avviene nelle fasi precoci del differenziamento delle cellule staminali.
3. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui l'inibitore della proteina è un anticorpo anti-Cripto o suoi frammenti funzionali.
4. Uso della proteina cripto o di suoi inibitori per la preparazione di una composizione in grado di modulare il differenziamento di cellule staminali verso la linea neuronale.

p.p. Gabriella Minchiotti, Silvia Parisi, Maria Persico

DE SIMONE & PARTNERS SpA

(OC)

dgs capasso



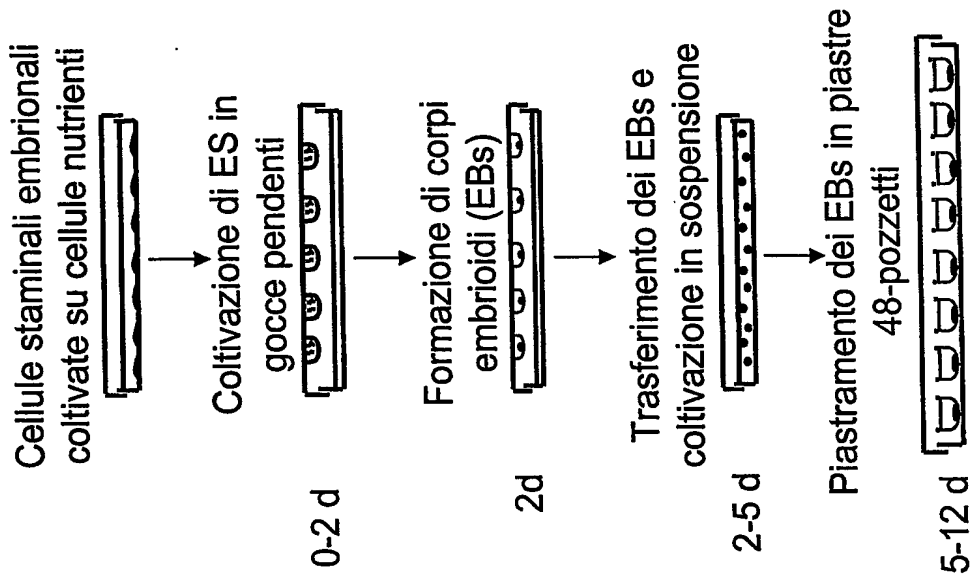
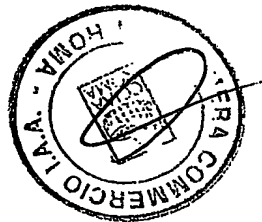


Figura 1



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N. d'iscri. 820 B)
Olga Capasso

RM 2003 A 000370

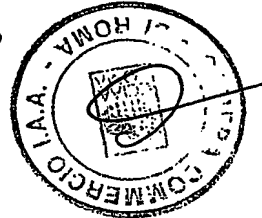
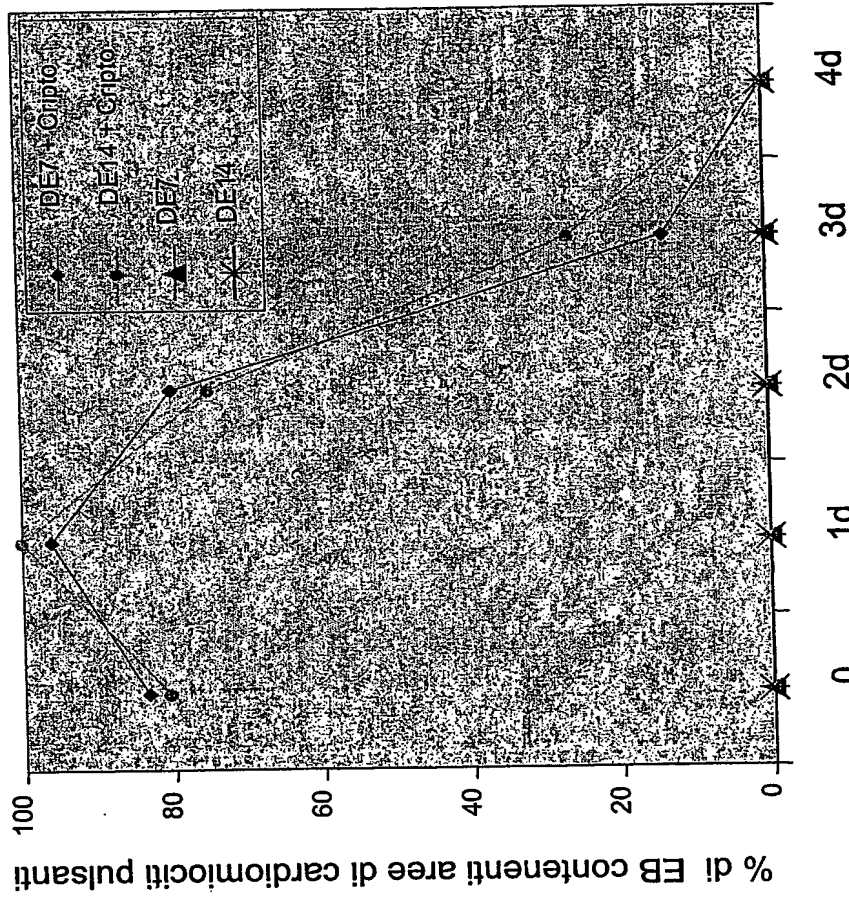
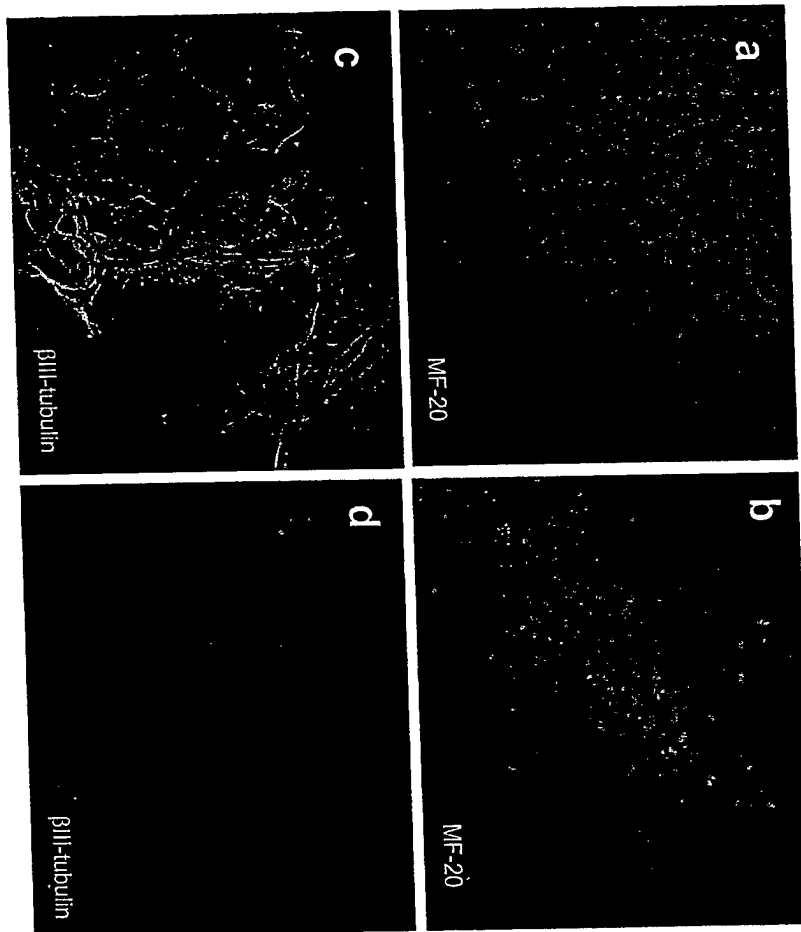


Figura 2

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

Olga Capasso

A

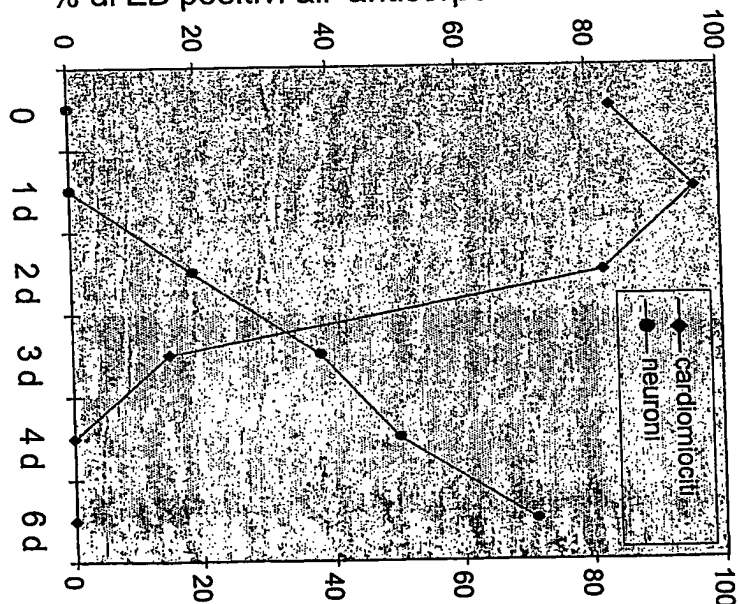


- Cripto

+ Cripto

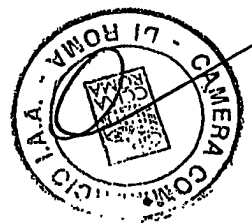
Figura 3

% di EB positivi all'anticorpo MF20



% di EB positivi alla β-tubulina III

B



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Sig. Capasso
(N° 10.100.1. 820 B)

01/01/2003

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.